

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003757

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-062853  
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP 2005/003757

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

07. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年    3 月    5 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 3  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号  
The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

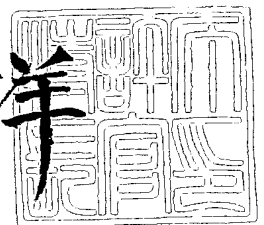
J P 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 3

出      願      人                      花王株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    4 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号    出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 3 5 6 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P01091603  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
C12N 1/21

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 遠藤 圭二

【発明者】  
【住所又は居所】 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内  
【氏名】 尾崎 克也

【特許出願人】  
【識別番号】 000000918  
【氏名又は名称】 花王株式会社

【代理人】  
【識別番号】 110000084  
【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所  
【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】  
【識別番号】 100068700  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】  
【識別番号】 100077562  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】  
【識別番号】 100096736  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】  
【識別番号】 100101317  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】  
【識別番号】 100117156  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】  
【識別番号】 100111028  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 山本 博人

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 164232  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

S i g A で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列に対して、S i g A 及び S i g E で認識されるように改変してなるプロモーター DNA。

**【請求項 2】**

S i g E で認識されるコンセンサス配列を構築することによって改変したものである請求項 1 のプロモーター DNA。

**【請求項 3】**

S i g E で認識されるコンセンサス配列が、ATAHTT (H は A 又は C 又は T) で表される - 35 領域と、その 13 若しくは 14 塩基後ろにつながる CATAYAHT (Y は C 又は T) で表される - 10 領域からなる塩基配列である請求項 2 のプロモーター DNA。

**【請求項 4】**

S i g A で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列が、配列番号 1 で示される塩基配列の塩基番号 92 ~ 552 の塩基配列、配列番号 2 で示される塩基配列の塩基番号 133 ~ 589 の塩基配列を含むか、又は当該塩基配列に対して 80 % 以上の同一性を有する塩基配列であって S i g A のコンセンサス配列を有するもの及び／又は同一のプロモーター機能を有するものを含むものである請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のプロモーター DNA。

**【請求項 5】**

S i g A で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列が 610 b p 以下のサイズである請求項 4 のプロモーター DNA。

**【請求項 6】**

S i g A で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列が、配列番号 1 で示される塩基配列、配列番号 2 で示される塩基配列、又は当該塩基配列に対して 90 % 以上の同一性を有する塩基配列であって S i g A のコンセンサス配列を有するもの及び／又は同一のプロモーター機能を有するものである請求項 1 記載のプロモーター DNA。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載のプロモーター DNA を含有する発現ベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 記載の発現ベクターを含む組換え微生物。

**【請求項 9】**

請求項 8 記載の組換え微生物を培養することを特徴とするタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

**【請求項 10】**

タンパク質がセルラーゼである請求項 9 記載の製造方法。

**【請求項 11】**

S i g A で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列に対して、S i g A 及び S i g E で認識されるように改変することを特徴とするプロモーター DNA の構築方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】改変プロモーター

【技術分野】

【0001】

本発明は、改変されたプロモーターDNA、当該DNAを含有する発現ベクター、当該発現ベクターを含む組換え微生物、及び当該組換え微生物を用いたタンパク質又はポリペプチドの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

微生物による有用物質の工業的生産は、アルコール飲料や味噌、醤油等の食品類をはじめとし、アミノ酸、有機酸、核酸関連物質、抗生物質、糖質、脂質、タンパク質等、その種類は多岐に渡っており、またその用途についても食品、医薬や、洗剤、化粧品等の日用品、或いは各種化成品原料に至るまで幅広い分野に広がっている。

【0003】

こうした微生物による有用物質の工業生産においては、その生産性の向上が重要な課題の一つであり、その手法として、突然変異等の遺伝学的手法による生産菌の育種が行われてきた。一方、微生物遺伝学、バイオテクノロジーの発展により、特に最近では、遺伝子組換え技術等を用いたより効率的な有用物質生産が注目されている。

【0004】

遺伝子の転写に必要なプロモーターに関する研究も数多く行なわれており、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) においては異種タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子を強力に転写するプロモーター領域として、例えば、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-64株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子のプロモーター領域 (例えば、非特許文献1参照) や、バチルス エスピー KSM-S237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子 (例えば、特許文献1参照) の上流部に存在するプロモーター領域等が利用されている。

【0005】

しかしながら、工業的な生産に於いては生産コストの低減化が必要であり、現在用いられている上記の様なプロモーター領域に於いても生産性向上の効果が必ずしも十分と言えるものではなく、更なる高い生産性が求められている。

【特許文献1】特開2000-210081号公報

【非特許文献1】*Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 2172, (1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写量を向上させ得る改変プロモーターDNA、更にはこれを用いたタンパク質又はポリペプチドの効率的な製造方法を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

枯草菌では、RNAポリメラーゼ複合体のサブユニットとしてプロモーター配列の認識に関与するシグマ因子が17個同定されており、栄養増殖期において生育に必須な遺伝子の転写に関与する主要シグマ因子 (ハウスキーピングシグマ因子) *SigA*をはじめ、胞子形成過程を制御するシグマ因子 *SigH*、*SigF*、*SigE*、*SigG*、*SigK*、べん毛形成や細胞壁溶解を制御するシグマ因子 *SigD*、ある種のアミノ酸や糖の代謝を制御するシグマ因子 *SigL*、環境変化への対応を制御するシグマ因子 *SigB* や *ECF* シグマと呼ばれるシグマ因子等が存在する。シグマ因子以外の5個 ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta'$ 、 $\delta$ 、 $\omega$ ) のサブユニットから成るRNAポリメラーゼコア複合体に結合した各シグマ因子は、シグマ因子毎に異なるプロモーター配列の認識に関与することにより、異なる遺伝子の転写を司り、これによって、ゲノム上に存在する4100余りの遺伝子について、状況に応じた遺伝子の発現制御を行っていると考えられている。

## 【0008】

栄養増殖期には主として *SigA* が RNA ポリメラーゼコア複合体と会合して、*SigA* が認識するプロモーターを有する遺伝子、またはオペロンの転写を誘導しているが、孢子形成期に入って孢子形成過程を制御するシグマ因子が活性化されると、RNA ポリメラーゼコア複合体と会合するシグマ因子の置換が起こり、*SigA* と会合する RNA ポリメラーゼの量は相対的に低下することが報告されている (J. Bacteriol., 179, 4969, (1999))。この為、孢子形成期以降、*SigA* により認識されるプロモーターからの転写量は相対的に低下するものと考えられる。

## 【0009】

斯かる実情に鑑み、本発明者らは、枯草菌のシグマ因子 *SigA* で認識されるプロモーターを含む DNA 断片に対して、遺伝子工学的操作を用いて塩基の改変を施し、当該プロモーター機能を残したまま、*SigE* で認識される配列を新たに構築した場合に、下流に連結されるタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写量を向上できることを見出した。

## 【0010】

すなわち本発明は、*SigA* で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列に対して、*SigA* 及び *SigE* で認識されるように改変してなるプロモーター DNA を提供するものである。

## 【0011】

また本発明は、当該プロモーター DNA を含有する発現ベクター、当該発現ベクターを含む組換え微生物、当該組換え微生物を培養することを特徴とするタンパク質又はポリペプチドの製造方法を提供するものである。

## 【0012】

また本発明は、*SigA* で認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列に対して、*SigA* 及び *SigE* で認識されるように改変することを特徴とするプロモーター DNA の構築方法を提供するものである。

## 【発明の効果】

## 【0013】

本発明のプロモーター DNA は、*SigA* と会合した RNA ポリメラーゼに加え、孢子形成期において、*SigE* と会合した RNA ポリメラーゼによっても転写される為、天然のプロモーターを用いた場合に比べて、下流に連結されるタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写量を遥かに向上させることができ、タンパク質又はポリペプチドを効率的に生産することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0014】

本発明においてアミノ酸配列および塩基配列の同一性は Lipman-Pearson 法 (Science, 227, 1435, (1985)) によって計算される。具体的には、遺伝情報処理ソフトウェア Genetyx-Win (ソフトウェア開発) のホモロジー解析 (Search homology) プログラムを用いて、パラメーターである Unit size to compare (ktup) を 2 として解析を行うことにより算出される。

## 【0015】

一般に、シグマ因子は転写開始点の上流 10 塩基及び 35 塩基付近に存在する数塩基の配列を認識して結合するとされており、それぞれ -10 領域、-35 領域と呼ばれている。また、両領域の配列、両領域間の距離は、シグマ因子毎にそれぞれ共通な特徴を持つことが知られており、コンセンサス配列と呼ばれ、プロモーターの本体を為すものと考えられている。*SigA* のコンセンサス配列は、TTGACA で表される -35 領域、その 14 塩基後ろにつながる tgnTAATAA で表される -10 領域からなることが報告されている (n は A 又は G 又は C 又は T。また大文字は保存性が高く、小文字は保存性が低いことを表す。Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells, Edited by A. L. Sonenshein, American Society for Microbiology, pp289, (2002))。そ

して、上記配列番号1の塩基番号92～552、配列番号2の塩基番号133～589の間には、S i g Aのコンセンサス配列が複数存在することが報告されている (Biosci Biotechnol Biochem. 64, 2281, 2000、Biosci Biotechnol Biochem. 56, 872, (1992))。

#### 【0016】

従って、本発明のS i g Aで認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列としては、配列番号1で示される塩基番号92～552の塩基配列、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号133～589の塩基配列を含むか、又は当該塩基配列に対して80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列であってS i g Aのコンセンサス配列を有するもの及び／又は同一のプロモーター機能を有するものを含むもの、或いは、配列番号1で示される塩基配列、配列番号2で示される塩基配列、又は当該塩基配列に対して90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列であって、S i g Aのコンセンサス配列を有するもの及び／又は同一のプロモーター機能を有するものであるのが好ましい。前記、配列番号1で示される塩基番号92～552の塩基配列を含む塩基配列としては、配列番号1において塩基番号92～552を含む461～570bpの連続した塩基配列が好ましく、より好ましくは461～520bp、特に461～480の連続した塩基配列が好ましい。前記、配列番号2で示される塩基配列の塩基番号133～589の塩基配列を含む塩基配列としては、配列番号2において塩基番号133～589を含む457～610bpの連続した塩基配列が好ましく、より好ましくは457～520bp、特に457～480bpの以下の連続した塩基配列が好ましい。

ここで、配列番号1で示される塩基配列はバチルス エスピーK S M-S 237株由来アルカリセルラーゼ遺伝子上流に存在するものであり、配列番号2で示される塩基配列はバチルス エスピーK S M-64株由来アルカリセルラーゼ遺伝子上流に存在するものであって、両者は95.6%の同一性を有している。

#### 【0017】

本発明のプロモーターDNAは、上記塩基配列に対して塩基の改変を施し、S i g Aに加え、S i g Eでも認識されるように構築される。ここで、構築されるプロモーター配列は、単独でも複数でもよい。

#### 【0018】

一方、S i g Eで認識されるプロモーター配列は、A T A H T T (HはA又はC又はT)で表される-35領域と、その13若しくは14塩基後ろにつながるC A T A Y A H T (YはC又はT)で表される-10領域からなる塩基配列、好ましくはA T A T T T Tで表される-35領域と、その13若しくは14塩基後ろにつながるC A T A C A A Tで表される-10領域からなる塩基配列、更に好ましくはA T A T T T C A A G T A G T A A T A A C A T A C A A Tからなる塩基配列であることが報告されており (J. Mol. Biol. 327, 945, (2003))、斯かる塩基配列が新たに構築されるのが好ましい。

本発明における最も好ましいプロモーターDNAは、配列番号8で示される、配列番号1を改変した塩基配列や、配列番号9で示される、配列番号2を改変した塩基配列が挙げられる。

#### 【0019】

塩基の改変は、上記S i g Eで認識されるプロモーター配列を有するDNA断片を挿入するか、或いは、1又は複数個の塩基を欠失、置換若しくは挿入することにより行われるが、このうち1又は複数個の塩基を置換することにより行われる方法が好ましい。すなわち、例えばプラスミドベクターにクローニングされたバチルス エスピーK S M-S 237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子上流に由来するDNA断片(配列番号1)やバチルス エスピーK S M-64株由来アルカリセルラーゼ遺伝子上流に由来するDNA断片(配列番号2)の任意の部位に、Kunkel法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82, 488, 1985)等の部位特異的変異導入法により制限酵素認識部位を導入し、一方、両端に該制限酵素認識部位を付加したS i g Eで認識されるプロモーター配列を含むDNA断片を化学合成などによって調製した後、当該制限酵素にて処理した両断片をリガーゼにより結合す

ることにより、S i g Eで認識されるプロモーター配列を挿入したプロモーターDNAを構築することが可能である。

#### 【0020】

また、配列番号1や配列番号2で示されるアルカリセルラーゼ遺伝子上流に由来するDNA断片の一部をSOE (splicing by overlap extension) -PCR法 (Gene, 77, 51, 1989) 等により塩基置換することにより、当該DNA断片を構築することが可能である。

#### 【0021】

以下、より具体的にSOE-PCR法を用いて配列番号1で示される塩基配列からなるDNA断片の一部に塩基置換を施すことにより、S i g Eで認識されるプロモーター (配列) を新たに構築する方法について説明する。

#### 【0022】

まず、1回目のPCRにより塩基置換を施した部位を下流末端とする上流側DNA断片と、塩基置換を施した部位を上流末端とする下流側DNA断片を調製するが、この際、例えば、上流側DNA断片の下流側および下流側DNA断片の上流側に用いるプライマーに、相互にアニールし、且つS i g Eで認識されるプロモーター配列が新たに構築される様にデザインを施しておく (図1)。

#### 【0023】

次いで、1回目のPCRにて調製した2種類のDNA断片を鋳型とし、上流側DNA断片の上流側プライマーと下流側DNA断片の下流側プライマーを用いて2回目のPCRを行うことによって、上流側DNA断片の下流末端と下流側DNA断片の上流末端の間でアニールが生じ、PCR増幅の結果、2つのDNA断片が連結し、その連結部分にS i g Eで認識されるプロモーター配列が新たに構築されたDNA断片を得ることができる (図1)。

#### 【0024】

このように構築されたプロモーターDNAは、S i g Aに加え、S i g Eによっても認識されるため、胞子形成期においても、その下流に連結されるタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写が可能となる。

すなわち、枯草菌により異種タンパク質またはポリペプチドを組換え生産させる際に、当該プロモーターDNAを目的タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子上流に連結することにより、該遺伝子が栄養増殖期においてS i g Aと会合したRNAポリメラーゼにより転写されることに加え、栄養増殖期につづく胞子形成期においてはS i g Eと会合したRNAポリメラーゼにより転写され、胞子形成期においても該遺伝子の転写が維持される。従って、当該プロモーターDNAを含有する発現ベクターを導入した組換え枯草菌は、S i g Eで認識されるプロモーター配列を新たに構築する前の天然のプロモーターを用いる場合に比べ、著量の目的タンパク質またはポリペプチドを生産することができる。

#### 【0025】

目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、特に限定されず、洗剤、食品、繊維、飼料、化学品、医療、診断など各種産業用酵素や、生理活性ペプチドなどが含まれる。また、産業用酵素の機能別には、酸化還元酵素 (Oxidoreductase)、転移酵素 (Transferase)、加水分解酵素 (Hydrolase)、脱離酵素 (Lyase)、異性化酵素 (Isomerase)、合成酵素 (Ligase/Synthetase) 等が含まれるが、好適にはセルラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼ、プロテアーゼ等の加水分解酵素の遺伝子が挙げられる。具体的には、多糖加水分解酵素の分類 (Biochem. J., 280, 309 (1991)) 中でファミリー5に属するセルラーゼが挙げられ、中でも微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセルラーゼが挙げられる。より具体的な例として、配列番号4又は配列番号6で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリセルラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるセルラーゼが挙げられる。



## 【0026】

また、 $\alpha$ -アミラーゼの具体例としては、微生物由来の $\alpha$ -アミラーゼが挙げられ、特にバチルス属細菌由来の液化型アミラーゼが好ましい。より具体的な例として、配列番号7で示されるアミノ酸配列からなるバチルス属細菌由来のアルカリアミラーゼや、当該アミノ酸配列と70%、好ましくは80%、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなるアミラーゼが挙げられる。また、プロテアーゼの具体例としては、微生物由来、特にバチルス属細菌由来のセリンプロテアーゼや金属プロテアーゼ等が挙げられる。

## 【0027】

一方、目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子は、本発明のプロモーターDNAに加え、当該遺伝子の翻訳、分泌に関わる制御領域、即ち、リボソーム結合部位(SD配列)および開始コドンを含む翻訳開始領域、又、分泌用シグナルペプチド領域が適正な形で結合されていることが望ましい。例えば、特開2000-210081号公報や特開平4-190793号公報等に記載されているバチルス属細菌、すなわちKSM-S237株(FERM BP-7875)やKSM-64株(FERM BP-2886)由来のセルラーゼ遺伝子の翻訳開始領域、分泌用シグナルペプチド領域、より具体的には配列番号3で示される塩基配列の塩基番号563~659の塩基配列や配列番号5で示される塩基配列からなるセルラーゼ遺伝子の塩基番号600~696の塩基配列、また当該塩基配列に対して70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有する塩基配列からなるDNA断片、あるいは上記いずれかの塩基配列の一部が欠失した塩基配列からなるDNA断片が、目的タンパク質又はポリペプチドの構造遺伝子と適正に結合されていることが望ましい。

## 【0028】

上記の目的タンパク質又はポリペプチド遺伝子を含むDNA断片の上流に本発明のプロモーターDNAを連結した上で適当なベクターに挿入した発現ベクターを、一般的な形質転換法によって枯草菌に取り込ませて組換え微生物を構築することにより目的タンパク質又はポリペプチドの生産性を向上させることができる。また、本発明のプロモーターDNAに枯草菌のゲノムとの適当な相同領域を結合したDNA断片を用い、枯草菌ゲノムに直接組み込むことによって構築した組換え菌株によっても目的タンパク質又はポリペプチドの生産性を向上させることができる。

## 【0029】

本発明のプロモーターDNAを用いた目的タンパク質又はポリペプチドの製造は、上記の組換え微生物を同化性の炭素源、窒素源、その他の必須成分を含む培地に接種し、通常の微生物培養法にて培養し、培養終了後、タンパク質又はポリペプチドを採取・精製することにより行えばよい。

## 【0030】

以下に、実施例を用いて、本発明のDNA断片の構築方法と、該DNA断片を利用したセルラーゼの組換え生産方法について具体的に説明する。

## 【実施例】

## 【0031】

実施例1 アルカリセルラーゼ遺伝子上流領域へのSigE認識プロモーター(配列)の構築

図2に示す様に、アルカリセルラーゼ遺伝子上流領域へのSigE認識プロモーター配列の導入を行なった。即ち、シャトルベクターpHY300PLKのBamHI制限酵素切断点に、バチルス エスピー (*Bacillus* sp.) KSM-S237株由来のアルカリセルラーゼ遺伝子(特開2000-210081号公報)をコードするDNA断片(3.1 kb)が挿入された組換えプラスミドpHY-S237を鋳型とし、表1に示した237UB1とEP1UPrのプライマーセットを用いてアルカリセルラーゼ遺伝子上流領域0.4 kb断片(A)を調製した。同様に表1に示したEP1DNfとS237RVのプライマーセットを用いてアルカリセルラーゼ遺伝子の下流領域2.7 kb断片(B)を調製

した。次いで、得られた(A)(B)2断片を混合して鋳型とし、表1に示した237UB1とS237RVのプライマーセットを用いたSOE-PCRを行うことによって、2断片を(A)(B)の順になる様に結合させ3.1kbのDNA断片(C)を得た。プライマーEP1UPrとEP1DNfにはそれぞれ塩基置換が施してあり、図2に示す様にDNA断片(C)ではアルカリセルラーゼ遺伝子の翻訳開始部位から約150bp上流の領域にSigE認識プロモーター(配列)が新たに構築された。得られた3.1kbのDNA断片(C)をシャトルベクターpHY300PLKのSmaI制限酵素切断点に挿入し、組換えプラスミドpHY-S237EP1を構築した。また組換えプラスミドpHY-S237を鋳型として、表1に示した237UB1とS237RVのプライマーセットを用いてアルカリセルラーゼ遺伝子全領域を含む3.1kb断片(D)を調製し、これをシャトルベクターpHY300PLKのSmaI制限酵素切断点に挿入して、組換えプラスミドpHY-S237Wを構築した。

## 【0032】

## 実施例2 アルカリセルラーゼ分泌生産評価

実施例1にて得られた組換えプラスミドpHY-S237EP1、及び対照として組換えプラスミドpHY-S237Wを、プロトプラスト形質転換法によって枯草菌168株に導入した。これによって得られた菌株を10mLのLB培地で一夜37℃で振盪培養を行い、更にこの培養液0.05mLを50mLの2×L-マルトース培地(2%トリプトン、1%酵母エキス、1%NaCl、7.5%マルトース、7.5ppm硫酸マンガン4-5水和物、15ppmテトラサイクリン)に接種し、30℃で3日間、振盪培養を行った。培養後、遠心分離によって菌体を除いた培養液上清のアルカリセルラーゼ活性を測定し、培養によって菌体外に分泌生産されたアルカリセルラーゼの量を求めた。この結果、表2に示した様に、組換えプラスミドとしてpHY-S237EP1を用いた場合、対照のpHY-S237W(野生型)の場合と比較して高いアルカリセルラーゼの分泌生産が認められた。このことから、pHY-S237EP1を用いた場合には、SigAで認識されるプロモーターからの転写に加え、新たに構築されたSigEで認識されるプロモーターからの転写が行なわれことにより、セルラーゼ分泌生産性が向上したものと推測された。

## 【0033】

## 【表1】

| プライマー  | 塩基配列                                     | 配列番号 |
|--------|--|------|
| 237UB1 | TTGCGGATCCAACAGGCTTATATTTAGAGGAAATTC     | 10   |
| EP1UPr | GTATGTTATTACTACTTGAAATATTCTACCCCCCTTCCTA | 11   |
| EP1DNf | ATATTTCAAGTAGTAATAACATACAATACTTATAAGTTG  | 12   |
| S237RV | TCGCTACCCTTTTATTATCG                     | 13   |

## 【0034】

## 【表2】

| 組換えプラスミド       | アルカリセルラーゼ分泌生産量(相対値) |
|----------------|---------------------|
| pHY-S237W(野生型) | 100                 |
| pHY-S237EP1    | 165                 |

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

【図1】SOE-PCR法を用いたSigE認識プロモーター配列の導入方法を示した概念図である。

【図2】SigE認識プロモーター配列を導入したアルカリセルラーゼ生産用プラスミドの構築方法を示した概念図である。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KAO CORPORATION

&lt;120&gt; Modified promoters

&lt;130&gt; P01091603

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 572

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-S237

<400> 1  
 gatttgccga tgcaacaggc ttatathtag aggaaatttc tttttaaatt gaatacggaa 60  
 taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat ttttttgagt ttttagaga actgaagatt 120  
 gaaataaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180  
 gcctttttat aattatttat acctagaacg aaaatactgt ttcgaaagcg gtttactata 240  
 aaaccittata ttccggctct tttttaaaac agggggtaaa aattcactct agtattctaa 300  
 tttcaacatg ctataataaa ttigtgaagac gcaatatgca tctctttttt tacgatatat 360  
 gtaagcgggtt aaccttgtgc tatatgccga tttaggaagg ggggtagatt gagtcaagta 420  
 gtaataatat agataactta taagttgttg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca 480  
 agttttttta aaactttaac gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga 540  
 ttcaattact ttaaaaatat ttaggaggta at 572

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-64

<400> 2  
 agtacttacc atttttagagt caaaagatag aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60  
 cttatattta gaggggaattt ctttttaaat tgaatacggg ataaaatcag gtaaacagg 120

cctgatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180  
acggacataa gaaaattgta ttagttttta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240  
tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc ggtttactat aaaaccttat attccggctc 300  
tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360  
atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcggtt aaccttgtgc 420  
tatatgccga tttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacttat 480  
aagttgttga gaagcaggag agaatctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540  
aagcactttc gggtatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600  
ggaggtaat 609

<210> 3  
<211> 3150  
<212> DNA  
<213> Bacillus sp. KSM-S237

<220>  
<221> CDS  
<222> (573)..(3044)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (573)..(659)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (660)..(3044)  
<223>

<400> 3  
gatttgccga tgcaacaggc ttatatattag aggaaatttc tttttaaatt gaatacggaa 60  
taaaatcagg taaacaggtc ctgattttat ttttttgagt tttttagaga actgaagatt 120  
gaaataaaaag tagaagacaa aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180  
gcctttttat aattatttat acctagaacg aaaatactgt ttcgaaagcg gtttactata 240  
aaaccttata ttccggctct tttttaaaac aggggggtaaa aattcactct agtattctaa 300

出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 3 5 6 1

|   |      |
|---|------|
| Val His Ala Pro Gly Asp Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys |      |
| 125 130 135   |      |
| gat ttc ttt aga gaa att gca gct tta tac cct aat aat cca cac att | 1121 |
| Asp Phe Phe Arg Glu Ile Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile |      |
| 140 145 150   |      |
| att tat gag tta gcg aat gag ccg agt agt aat aat aat ggt gga gca | 1169 |
| Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala |      |
| 155 160 165 170   |      |
| ggg att ccg aat aac gaa gaa ggt tgg aaa gcg gta aaa gaa tat gct | 1217 |
| Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala |      |
| 175 180 185   |      |
| gat cca att gta gaa atg tta cgt aaa agc ggt aat gca gat gac aac | 1265 |
| Asp Pro Ile Val Glu Met Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn |      |
| 190 195 200   |      |
| att atc att gtt ggt agt cca aac tgg agt cag cgt ccg gac tta gca | 1313 |
| Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala |      |
| 205 210 215   |      |
| gct gat aat cca att gat gat cac cat aca atg tat act gtt cac ttc | 1361 |
| Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe |      |
| 220 225 230   |      |
| tac act ggt tca cat gct gct tca act gaa agc tat ccg tct gaa act | 1409 |
| Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr |      |
| 235 240 245 250   |      |
| cct aac tct gaa aga gga aac gta atg agt aac act cgt tat gcg tta | 1457 |
| Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu |      |
| 255 260 265   |      |
| gaa aac gga gta gcg gta ttt gca aca gag tgg gga acg agt caa gct | 1505 |
| Glu Asn Gly Val Ala Val Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala |      |
| 270 275 280   |      |
| agt gga gac ggt ggt cct tac ttt gat gaa gca gat gta tgg att gaa | 1553 |
| Ser Gly Asp Gly Gly Pro Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu |      |
| 285 290 295   |      |
| ttt tta aat gaa aac aac att agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat | 1601 |
| Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn |      |
| 300 305 310   |      |
| aaa aat gaa gta tct ggt gca ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct | 1649 |
| Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser |      |
| 315 320 325 330   |      |

aac gca acc aat ctt gac cca ggt cca gat cat gtg tgg gca cca gaa 1697  
 Asn Ala Thr Asn Leu Asp Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu  
 335 340 345

gaa tta agt ctt tct gga gaa tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg 1745  
 Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val  
 350 355 360

aac tat gag cca atc gac cgt aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac 1793  
 Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp  
 365 370 375

ttt aat gat gga acg aag caa gga ttt gga gtg aat tcg gat tct cca 1841  
 Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro  
 380 385 390

aat aaa gaa ctt att gca gtt gat aat gaa aac aac act ttg aaa gtt 1889  
 Asn Lys Glu Leu Ile Ala Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val  
 395 400 405 410

tcg gga tta gat gta agt aac gat gtt tca gat ggc aac ttc tgg gct 1937  
 Ser Gly Leu Asp Val Ser Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala  
 415 420 425

aat gct cgt ctt tct gcc aac ggt tgg gga aaa agt gtt gat att tta 1985  
 Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu  
 430 435 440

ggt gct gag aag ctt aca atg gat gtt att gtt gat gaa cca acg acg 2033  
 Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr  
 445 450 455

gta gct att gcg gcg att cca caa agt agt aaa agt gga tgg gca aat 2081  
 Val Ala Ile Ala Ala Ile Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn  
 460 465 470

cca gag cgt gct gtt cga gtg aac gcg gaa gat ttt gtc cag caa acg 2129  
 Pro Glu Arg Ala Val Arg Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr  
 475 480 485 490

gac ggt aag tat aaa gct gga tta aca att aca gga gaa gat gct cct 2177  
 Asp Gly Lys Tyr Lys Ala Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro  
 495 500 505

aac cta aaa aat atc gct ttt cat gaa gaa gat aac aat atg aac aac 2225  
 Asn Leu Lys Asn Ile Ala Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn  
 510 515 520

atc att ctg ttc gtg gga act gat gca gct gac gtt att tac tta gat 2273



Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp  
 525 530 535

aac att aaa gta att gga aca gaa gtt gaa att cca gtt gtt cat gat 2321  
 Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp  
 540 545 550

cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct gtt ttt gaa gac ggt aca cgt 2369  
 Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg  
 555 560 565 570

caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct ggt gtg aaa aca gct tta aca 2417  
 Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr  
 575 580 585

att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg tta tca tgg gaa ttt gga tat 2465  
 Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr  
 590 595 600

cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg gca aca gct cca cgt tta gat 2513  
 Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp  
 605 610 615

ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt gag aat gat tat gta gct ttt 2561  
 Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe  
 620 625 630

gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca aca gaa ggc gca atg aat atc 2609  
 Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile  
 635 640 645 650

aat tta gta ttc cag cca cct act aac ggg tat tgg gta caa gca cca 2657  
 Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro  
 655 660 665

aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa tta gag gaa gcg aat caa gta 2705  
 Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val  
 670 675 680

aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa att aac gta aga gat att aca 2753  
 Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr  
 685 690 695

aac att caa gat gac acg tta cta cgt aac atg atg atc att ttt gca 2801  
 Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala  
 700 705 710

gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga gtc ttt gta gat aat gtt cgt 2849  
 Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg  
 715 720 725 730

ttt gag ggg gct gct act act gag ccg gtt gaa cca gag cca gtt gat 2897  
Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp  
735 740 745

cct ggc gaa gag acg cca cct gtc gat gag aag gaa gcg aaa aaa gaa 2945  
Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu  
750 755 760

caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa gaa gca gta aaa gaa gaa aag 2993  
Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys  
765 770 775

aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca gtc aaa aat gag gct aag aaa 3041  
Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys  
780 785 790

aaa taatctatta aactagttat agggttatct aaaggtctga ttagatctt 3094  
Lys  
795

ttagataacc tttttcttgc ataactggac acagagttgt tattaaagaa agtaag 3150

<210> 4  
<211> 795  
<212> PRT  
<213> Bacillus sp. KSM-S237

<400> 4

Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn  
1 5 10 15

Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu  
20 25 30

Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln  
35 40 45

Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu  
50 55 60

Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ser Asn Asp Trp Asp Ser Asn Met  
65 70 75 80

Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Thr Asn Pro  
85 90 95

Glu Leu Ile Lys Gln Arg Val Ile Asp Gly Ile Glu Leu Ala Ile Glu  
100 105 110

Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp  
115 120 125

Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Lys Asp Phe Phe Arg Glu Ile  
130 135 140

Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn  
145 150 155 160

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu  
165 170 175

Glu Gly Trp Lys Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met  
180 185 190

Leu Arg Lys Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser  
195 200 205

Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp  
210 215 220

Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala  
225 230 235 240

Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly  
245 250 255

Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val  
260 265 270

Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Ser Gly Asp Gly Gly Pro

275

280

285

Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn  
290 295 300

Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly  
305 310 315 320

Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Asn Leu Asp  
325 330 335

Pro Gly Pro Asp His Val Trp Ala Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly  
340 345 350

Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp  
355 360 365

Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys  
370 375 380

Gln Gly Phe Gly Val Asn Ser Asp Ser Pro Asn Lys Glu Leu Ile Ala  
385 390 395 400

Val Asp Asn Glu Asn Asn Thr Leu Lys Val Ser Gly Leu Asp Val Ser  
405 410 415

Asn Asp Val Ser Asp Gly Asn Phe Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala  
420 425 430

Asn Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr  
435 440 445

Met Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ala Ile Ala Ala Ile  
450 455 460

Pro Gln Ser Ser Lys Ser Gly Trp Ala Asn Pro Glu Arg Ala Val Arg  
465 470 475 480

Val Asn Ala Glu Asp Phe Val Gln Gln Thr Asp Gly Lys Tyr Lys Ala  
485 490 495

Gly Leu Thr Ile Thr Gly Glu Asp Ala Pro Asn Leu Lys Asn Ile Ala  
500 505 510

Phe His Glu Glu Asp Asn Asn Met Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly  
515 520 525

Thr Asp Ala Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly  
530 535 540

Thr Glu Val Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val  
545 550 555 560

Leu Pro Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala  
565 570 575

Gly Glu Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly  
580 585 590

Ser Asn Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser  
595 600 605

Asp Asn Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu  
610 615 620

Val Arg Gly Glu Asn Asp Tyr Val Ala Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro  
625 630 635 640

Val Arg Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro  
645 650 655

Pro Thr Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn  
660 665 670

Phe Asp Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr

675

680

685

Glu Val Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr  
690 695 700

Leu Leu Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe  
705 710 715 720

Ala Gly Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr  
725 730 735

Thr Glu Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro  
740 745 750

Pro Val Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys  
755 760 765

Glu Glu Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu  
770 775 780

Lys Lys Ala Val Lys Asn Glu Ala Lys Lys Lys  
785 790 795

<210> 5  
<211> 3332  
<212> DNA  
<213> Bacillus sp. KSM-64

<220>  
<221> CDS  
<222> (610)..(3075)  
<223>

<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (610)..(696)  
<223>

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (697)..(3075)  
<223>

<400> 5  
 agtacttacc atttttagagt caaaagatag aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60  
 cttatatatta gaggggaattt ctttttaaat tgaatacggga ataaaatcag gtaaacaggt 120  
 cctgatttta tttttttgaa tttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180  
 acggacataa gaaaattgta ttagttttta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240  
 tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc ggtttactat aaaaccttat attccggctc 300  
 tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360  
 atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcggtt aaccttgtgc 420  
 tatatgccga ttttaggaagg gggtagattg agtcaagtag tcataattta gataacttat 480  
 aagttgttga gaagcaggag agaatctggg ttactcacia gttttttaaa acattatcga 540  
 aagcactttc ggttatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600  
 ggaggtaat atg atg tta aga aag aaa aca aag cag ttg att tct tcc att 651  
 Met Met Leu Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ile Ser Ser Ile  
 -25 -20  
 ctt att tta gtt tta ctt cta tct tta ttt ccg aca gct ctt gca gca 699  
 Leu Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Leu Phe Pro Thr Ala Leu Ala Ala  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gaa gga aac act cgt gaa gac aat ttt aaa cat tta tta ggt aat gac 747  
 Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn Asp  
 5 10 15  
 aat gtt aaa cgc cct tct gag gct ggc gca tta caa tta caa gaa gtc 795  
 Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu Val  
 20 25 30  
 gat gga caa atg aca tta gta gat caa cat gga gaa aaa att caa tta 843  
 Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln Leu  
 35 40 45  
 cgt gga atg agt aca cac gga tta caa tgg ttt cct gag atc ttg aat 891  
 Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu Asn  
 50 55 60 65  
 gat aac gca tac aaa gct ctt gct aac gat tgg gaa tca aat atg att 939  
 Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met Ile  
 70 75 80

cgt cta gct atg tat gtc ggt gaa aat ggc tat gct tca aat cca gag 987  
 Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro Glu  
 85 90 95

tta att aaa agc aga gtc att aaa gga ata gat ctt gct att gaa aat 1035  
 Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu Asn  
 100 105 110

gac atg tat gtc atc gtt gat tgg cat gta cat gca cct ggt gat cct 1083  
 Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp Pro  
 115 120 125

aga gat ccc gtt tac gct gga gca gaa gat ttc ttt aga gat att gca 1131  
 Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile Ala  
 130 135 140 145

gca tta tat cct aac aat cca cac att att tat gag tta gcg aat gag 1179  
 Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn Glu  
 150 155 160

cca agt agt aac aat aat ggt gga gct ggg att cca aat aat gaa gaa 1227  
 Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu Glu  
 165 170 175

ggt tgg aat gcg gta aaa gaa tac gct gat cca att gta gaa atg tta 1275  
 Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met Leu  
 180 185 190

cgt gat agc ggg aac gca gat gac aat att atc att gtg ggt agt cca 1323  
 Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser Pro  
 195 200 205

aac tgg agt cag cgt cct gac tta gca gct gat aat cca att gat gat 1371  
 Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp Asp  
 210 215 220 225

cac cat aca atg tat act gtt cac ttc tac act ggt tca cat gct gct 1419  
 His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala Ala  
 230 235 240

tca act gaa agc tat ccg cct gaa act cct aac tct gaa aga gga aac 1467  
 Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly Asn  
 245 250 255

gta atg agt aac act cgt tat gcg tta gaa aac gga gta gca gta ttt 1515  
 Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val Phe  
 260 265 270

gca aca gag tgg gga act agc caa gca aat gga gat ggt ggt cct tac 1563  
 Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro Tyr



| 275   | 280 | 285 |      |
|---|-----|-----|------|
| ttt gat gaa gca gat gta tgg att gag ttt tta aat gaa aac aac att<br>Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn Ile<br>290 295 300 305 |     |     | 1611 |
| agc tgg gct aac tgg tct tta acg aat aaa aat gaa gta tct ggt gca<br>Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly Ala<br>310 315 320     |     |     | 1659 |
| ttt aca cca ttc gag tta ggt aag tct aac gca aca agt ctt gac cca<br>Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp Pro<br>325 330 335     |     |     | 1707 |
| ggg cca gac caa gta tgg gta cca gaa gag tta agt ctt tct gga gaa<br>Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly Glu<br>340 345 350     |     |     | 1755 |
| tat gta cgt gct cgt att aaa ggt gtg aac tat gag cca atc gac cgt<br>Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp Arg<br>355 360 365     |     |     | 1803 |
| aca aaa tac acg aaa gta ctt tgg gac ttt aat gat gga acg aag caa<br>Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys Gln<br>370 375 380 385 |     |     | 1851 |
| gga ttt gga gtg aat gga gat tct cca gtt gaa gat gta gtt att gag<br>Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile Glu<br>390 395 400     |     |     | 1899 |
| aat gaa gcg ggc gct tta aaa ctt tca gga tta gat gca agt aat gat<br>Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn Asp<br>405 410 415     |     |     | 1947 |
| gtt tct gaa ggt aat tac tgg gct aat gct cgt ctt tct gcc gac ggt<br>Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp Gly<br>420 425 430     |     |     | 1995 |
| tgg gga aaa agt gtt gat att tta ggt gct gaa aaa ctt act atg gat<br>Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met Asp<br>435 440 445     |     |     | 2043 |
| gtg att gtt gat gag ccg acc acg gta tca att gct gca att cca caa<br>Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro Gln<br>450 455 460 465 |     |     | 2091 |
| ggg cca tca gcc aat tgg gtt aat cca aat cgt gca att aag gtt gag<br>Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val Glu<br>470 475 480     |     |     | 2139 |

cca act aat ttc gta ccg tta gga gat aag ttt aaa gcg gaa tta act 2187  
 Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu Thr  
 485 490 495

ata act tca gct gac tct cca tcg tta gaa gct att gcg atg cat gct 2235  
 Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His Ala  
 500 505 510

gaa aat aac aac atc aac aac atc att ctt ttt gta gga act gaa ggt 2283  
 Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu Gly  
 515 520 525

gct gat gtt atc tat tta gat aac att aaa gta att gga aca gaa gtt 2331  
 Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu Val  
 530 535 540 545

gaa att cca gtt gtt cat gat cca aaa gga gaa gct gtt ctt cct tct 2379  
 Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro Ser  
 550 555 560

gtt ttt gaa gac ggt aca cgt caa ggt tgg gac tgg gct gga gag tct 2427  
 Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu Ser  
 565 570 575

ggt gtg aaa aca gct tta aca att gaa gaa gca aac ggt tct aac gcg 2475  
 Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn Ala  
 580 585 590

tta tca tgg gaa ttt gga tac cca gaa gta aaa cct agt gat aac tgg 2523  
 Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn Trp  
 595 600 605

gca aca gct cca cgt tta gat ttc tgg aaa tct gac ttg gtt cgc ggt 2571  
 Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg Gly  
 610 615 620 625

gaa aat gat tat gta act ttt gat ttc tat cta gat cca gtt cgt gca 2619  
 Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg Ala  
 630 635 640

aca gaa ggc gca atg aat atc aat tta gta ttc cag cca cct act aac 2667  
 Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr Asn  
 645 650 655

ggg tat tgg gta caa gca cca aaa acg tat acg att aac ttt gat gaa 2715  
 Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp Glu  
 660 665 670

tta gag gaa gcg aat caa gta aat ggt tta tat cac tat gaa gtg aaa 2763  
 Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val Lys

675

680

685

att aac gta aga gat att aca aac att caa gat gac acg tta cta cgt 2811  
 Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu Arg  
 690 695 700 705

aac atg atg atc att ttt gca gat gta gaa agt gac ttt gca ggg aga 2859  
 Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly Arg  
 710 715 720

gtc ttt gta gat aat gtt cgt ttt gag ggg gct gct act act gag ccg 2907  
 Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu Pro  
 725 730 735

gtt gaa cca gag cca gtt gat cct ggc gaa gag acg ccg cct gtc gat 2955  
 Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val Asp  
 740 745 750

gag aag gaa gcg aaa aaa gaa caa aaa gaa gca gag aaa gaa gag aaa 3003  
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu Lys  
 755 760 765

gaa gca gta aaa gaa gaa aag aaa gaa gct aaa gaa gaa aag aaa gca 3051  
 Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys Ala  
 770 775 780 785

atc aaa aat gag gct acg aaa aaa taatctaata aactagttat agggttatct 3105  
 Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys  
 790

aaaggctctga tgcagatctt ttagataacc tttttttgca taactggaca tagaatggtt 3165

attaaagaaa gcaagggtgtt tatacgatat taaaaaggta gcgattttta attgaaacct 3225

ttaataatgt cttgtgatag aatgatgaag taatttaaga gggggaaacg aagtgaaaac 3285

ggaaatttct agtagaagaa aaacagacca agaaataactg caagctt 3332

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 793

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bacillus sp. KSM-64

&lt;400&gt; 6

Ala Glu Gly Asn Thr Arg Glu Asp Asn Phe Lys His Leu Leu Gly Asn  
 1 5 10 15

Asp Asn Val Lys Arg Pro Ser Glu Ala Gly Ala Leu Gln Leu Gln Glu  
20 25 30

Val Asp Gly Gln Met Thr Leu Val Asp Gln His Gly Glu Lys Ile Gln  
35 40 45

Leu Arg Gly Met Ser Thr His Gly Leu Gln Trp Phe Pro Glu Ile Leu  
50 55 60

Asn Asp Asn Ala Tyr Lys Ala Leu Ala Asn Asp Trp Glu Ser Asn Met  
65 70 75 80

Ile Arg Leu Ala Met Tyr Val Gly Glu Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Pro  
85 90 95

Glu Leu Ile Lys Ser Arg Val Ile Lys Gly Ile Asp Leu Ala Ile Glu  
100 105 110

Asn Asp Met Tyr Val Ile Val Asp Trp His Val His Ala Pro Gly Asp  
115 120 125

Pro Arg Asp Pro Val Tyr Ala Gly Ala Glu Asp Phe Phe Arg Asp Ile  
130 135 140

Ala Ala Leu Tyr Pro Asn Asn Pro His Ile Ile Tyr Glu Leu Ala Asn  
145 150 155 160

Glu Pro Ser Ser Asn Asn Asn Gly Gly Ala Gly Ile Pro Asn Asn Glu  
165 170 175

Glu Gly Trp Asn Ala Val Lys Glu Tyr Ala Asp Pro Ile Val Glu Met  
180 185 190

Leu Arg Asp Ser Gly Asn Ala Asp Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Ser  
195 200 205

Pro Asn Trp Ser Gln Arg Pro Asp Leu Ala Ala Asp Asn Pro Ile Asp  
210 215 220

Asp His His Thr Met Tyr Thr Val His Phe Tyr Thr Gly Ser His Ala  
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Glu Ser Tyr Pro Pro Glu Thr Pro Asn Ser Glu Arg Gly  
 245 250 255

Asn Val Met Ser Asn Thr Arg Tyr Ala Leu Glu Asn Gly Val Ala Val  
 260 265 270

Phe Ala Thr Glu Trp Gly Thr Ser Gln Ala Asn Gly Asp Gly Gly Pro  
 275 280 285

Tyr Phe Asp Glu Ala Asp Val Trp Ile Glu Phe Leu Asn Glu Asn Asn  
 290 295 300

Ile Ser Trp Ala Asn Trp Ser Leu Thr Asn Lys Asn Glu Val Ser Gly  
 305 310 315 320

Ala Phe Thr Pro Phe Glu Leu Gly Lys Ser Asn Ala Thr Ser Leu Asp  
 325 330 335

Pro Gly Pro Asp Gln Val Trp Val Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Gly  
 340 345 350

Glu Tyr Val Arg Ala Arg Ile Lys Gly Val Asn Tyr Glu Pro Ile Asp  
 355 360 365

Arg Thr Lys Tyr Thr Lys Val Leu Trp Asp Phe Asn Asp Gly Thr Lys  
 370 375 380

Gln Gly Phe Gly Val Asn Gly Asp Ser Pro Val Glu Asp Val Val Ile  
 385 390 395 400

Glu Asn Glu Ala Gly Ala Leu Lys Leu Ser Gly Leu Asp Ala Ser Asn  
 405 410 415

Asp Val Ser Glu Gly Asn Tyr Trp Ala Asn Ala Arg Leu Ser Ala Asp  
420 425 430

Gly Trp Gly Lys Ser Val Asp Ile Leu Gly Ala Glu Lys Leu Thr Met  
435 440 445

Asp Val Ile Val Asp Glu Pro Thr Thr Val Ser Ile Ala Ala Ile Pro  
450 455 460

Gln Gly Pro Ser Ala Asn Trp Val Asn Pro Asn Arg Ala Ile Lys Val  
465 470 475 480

Glu Pro Thr Asn Phe Val Pro Leu Gly Asp Lys Phe Lys Ala Glu Leu  
485 490 495

Thr Ile Thr Ser Ala Asp Ser Pro Ser Leu Glu Ala Ile Ala Met His  
500 505 510

Ala Glu Asn Asn Asn Ile Asn Asn Ile Ile Leu Phe Val Gly Thr Glu  
515 520 525

Gly Ala Asp Val Ile Tyr Leu Asp Asn Ile Lys Val Ile Gly Thr Glu  
530 535 540

Val Glu Ile Pro Val Val His Asp Pro Lys Gly Glu Ala Val Leu Pro  
545 550 555 560

Ser Val Phe Glu Asp Gly Thr Arg Gln Gly Trp Asp Trp Ala Gly Glu  
565 570 575

Ser Gly Val Lys Thr Ala Leu Thr Ile Glu Glu Ala Asn Gly Ser Asn  
580 585 590

Ala Leu Ser Trp Glu Phe Gly Tyr Pro Glu Val Lys Pro Ser Asp Asn  
595 600 605

Trp Ala Thr Ala Pro Arg Leu Asp Phe Trp Lys Ser Asp Leu Val Arg  
610 615 620

Gly Glu Asn Asp Tyr Val Thr Phe Asp Phe Tyr Leu Asp Pro Val Arg  
625 630 635 640

Ala Thr Glu Gly Ala Met Asn Ile Asn Leu Val Phe Gln Pro Pro Thr  
645 650 655

Asn Gly Tyr Trp Val Gln Ala Pro Lys Thr Tyr Thr Ile Asn Phe Asp  
660 665 670

Glu Leu Glu Glu Ala Asn Gln Val Asn Gly Leu Tyr His Tyr Glu Val  
675 680 685

Lys Ile Asn Val Arg Asp Ile Thr Asn Ile Gln Asp Asp Thr Leu Leu  
690 695 700

Arg Asn Met Met Ile Ile Phe Ala Asp Val Glu Ser Asp Phe Ala Gly  
705 710 715 720

Arg Val Phe Val Asp Asn Val Arg Phe Glu Gly Ala Ala Thr Thr Glu  
725 730 735

Pro Val Glu Pro Glu Pro Val Asp Pro Gly Glu Glu Thr Pro Pro Val  
740 745 750

Asp Glu Lys Glu Ala Lys Lys Glu Gln Lys Glu Ala Glu Lys Glu Glu  
755 760 765

Lys Glu Ala Val Lys Glu Glu Lys Lys Glu Ala Lys Glu Glu Lys Lys  
770 775 780

Ala Ile Lys Asn Glu Ala Thr Lys Lys  
785 790

<210> 7

<211>

<212> PRT

<213> Bacillus sp. KSM-K38

&lt;400&gt; 7

Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Ala Leu  
20 25 30

Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
35 40 45

Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
65 70 75 80

Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn  
85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr  
100 105 110

Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp  
115 120 125

Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser  
130 135 140

Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe  
145 150 155 160

Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg  
165 170 175

Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn  
180 185 190



Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val  
195 200 205

Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp  
210 215 220

Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr  
225 230 235 240

Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu  
245 250 255

Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe  
260 265 270

Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu  
275 280 285

Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met  
290 295 300

Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala  
305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu  
325 330 335

Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu  
340 345 350

Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly  
355 360 365

Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu  
370 375 380

Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe

385                      390                      395                      400

Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg  
405 410 415

Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asn Gly Pro Gly Gly Ser  
420 425 430

Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp  
435 440 445

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp  
450 455 460

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln  
465 470 475 480

|       |                       |
|-------|-----------------------|
| <210> | 8                     |
| <211> | 572                   |
| <212> | DNA                   |
| <213> | Bacillus sp. KSM-S237 |

|            |            |  |
|------------|------------|--|
| <400>      | 8          |  |
| gatttgccga | tgcaacaggc | ttatatattag aggaaatttc tttttaaaatt gaatacggaa 60 |
| taaaatcagg | taaacaggtc | ctgattttat ttttttgagt tttttagaga actgaagatt 120  |
| gaaataaaag | tagaagacaa | aggacataag aaaattgcat tagttttaat tatagaaaac 180  |
| gcctttttat | aattatttat | acctagaacg aaaatactgt ttcgaaagcg gtttactata 240  |
| aaaccttata | ttccggctct | tttttaaaac aggggggtaaa aattcactct agtattctaa 300 |
| tttcaacatg | ctataataaa | tttgtaagac gcaatatgca tctctttttt tacgatatat 360  |
| gtaagcgggt | aaccttgtgc | tatatgccga tttaggaagg ggggtagaat atttcaagta 420  |
| gtaataacat | acaatactta | taagttgttg agaagcagga gagcatctgg gttactcaca 480  |
| agttttttta | aaactttaac | gaaagcactt tcggtaatgc ttatgaattt agctatttga 540  |
| ttcaattact | ttaaaaatat | ttaggaggta at 572                                |

<210> 9  
<211> 609  
<212> DNA  
<213> Bacillus sp. KSM-64

<400> 9  
agtacttacc attttagagt caaaagatag aagccaagca ggatttgccg atgcaaccgg 60  
cttatattta gaggggaattt ctttttaa at tgaatacggga ataaaatcag gtaaacaggt 120  
cctgatttta ttttttigaa ttttttgag aactaaagat tgaaatagaa gtagaagaca 180  
acggacataa gaaaattgta ttagtttta ttatagaaaa cgcttttcta taattattta 240  
tacctagaac gaaaatactg tttcgaaagc ggtttactat aaaaccttat attccggctc 300  
tttttttaaa caggggggtga aaattcactc tagtattcta atttcaacat gctataataa 360  
atttgtaaga cgcaatatac atcttttttt tatgatattt gtaagcgggtt aaccttgtgc 420  
tatatgccga tttaggaagg gggtagaata tttcaagtag taataacata caatacttat 480  
aagttgttga gaagcaggag agaatctggg ttactcaciaa gtttttttaa acattatcga 540  
aagcactttc ggttatgctt atgaatttag ctatttgatt caattacttt aataatttta 600  
ggaggtaat 609

<210> 10  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<400> 10  
ttgcggatcc aacaggctta tatttagagg aaatttc

<210> 11  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<400> 11  
gtatgttatt actacttgaa atattctacc ccccttccta

<210> 12  
<211> 39  
<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 12  
atatttcaag tagtaataac atacaatact tataagttg

<210> 13

<211> 20

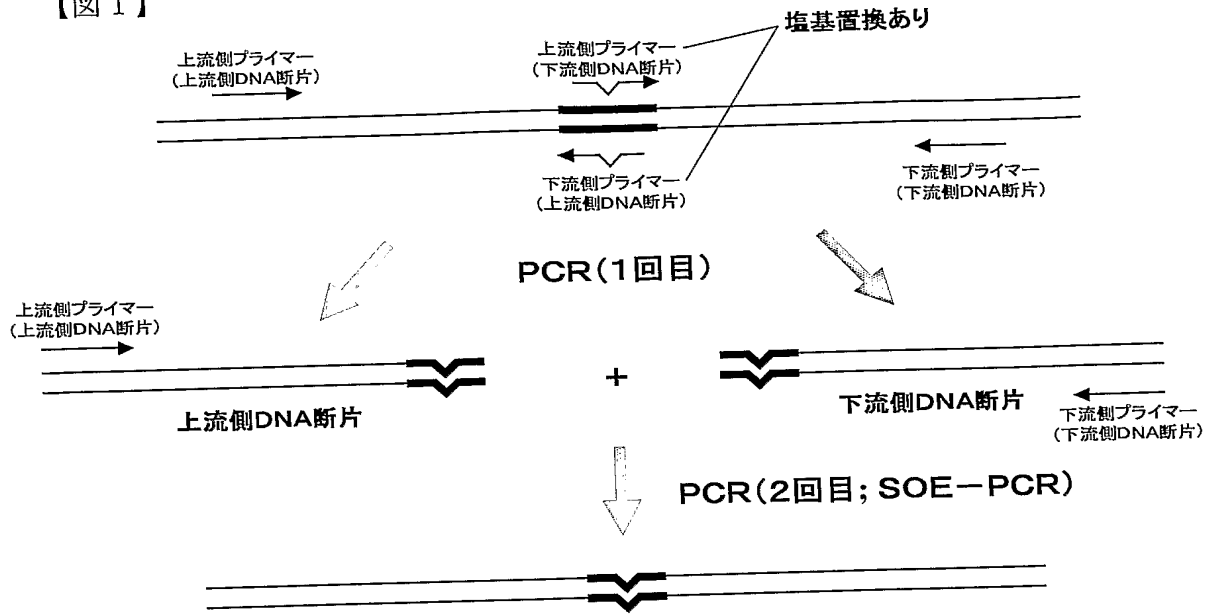
<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 13  
tcgctaccct tttattatcg

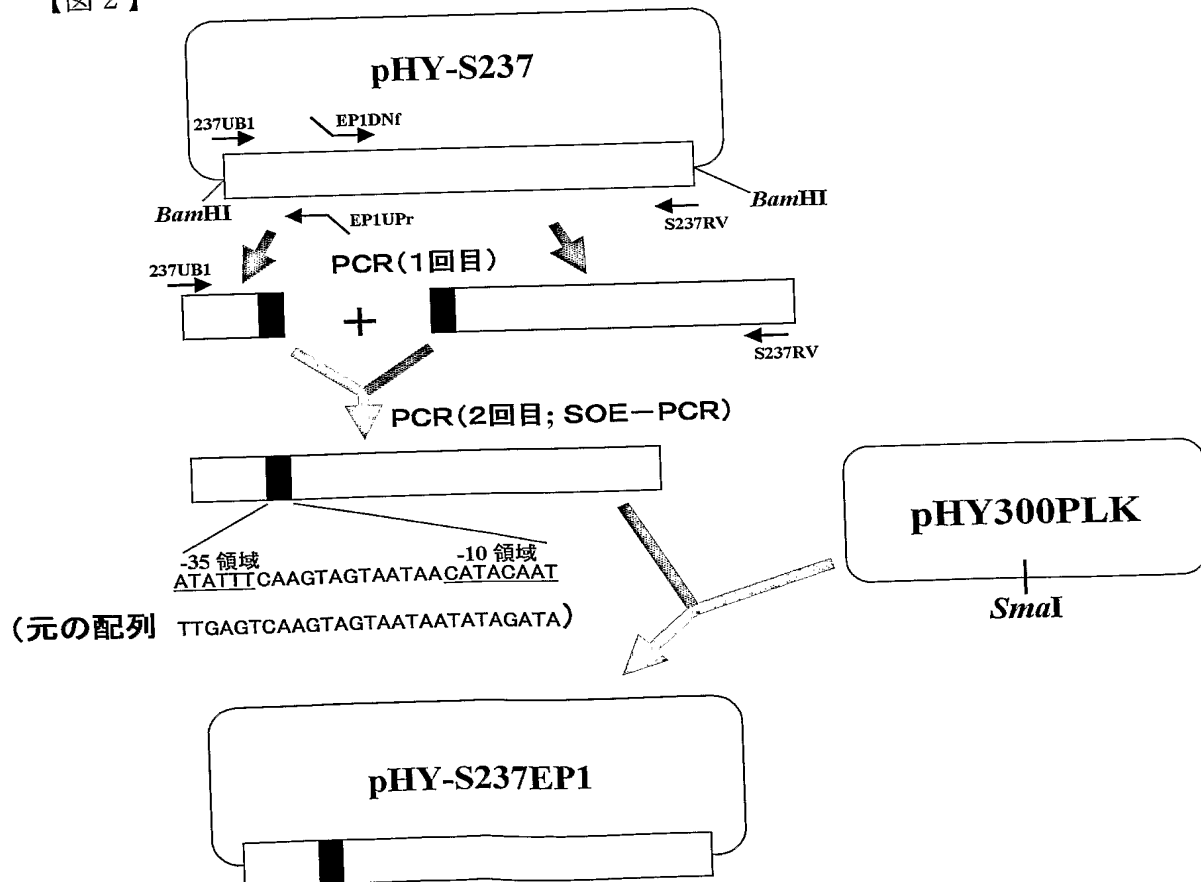
【書類名】 図面

【図 1】



SigEで認識されるプロモーター配列が導入されたDNA断片

【図 2】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 タンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の転写量を向上させ得る改変プロモーターDNA、更にはこれを用いたタンパク質又はポリペプチドの効率的な製造方法を提供する。

【解決手段】 SigAで認識されるプロモーター及びその近傍の塩基を含む塩基配列に対して、SigA及びSigEで認識されるように改変してなるプロモーターDNA；当該プロモーターDNAを含有する発現ベクター、当該発現ベクターを含む組換え微生物、当該組換え微生物を培養することを特徴とするタンパク質又はポリペプチドの製造方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 3 |
| 受付番号    | 5 0 4 0 0 3 7 0 5 9 1    |
| 書類名     | 特許願                      |
| 担当官     | 第五担当上席 0 0 9 4           |
| 作成日     | 平成 1 6 年 3 月 8 日         |

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】

平成 16 年 3 月 5 日

特願 2 0 0 4 - 0 6 2 8 5 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 9 1 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋茅場町 1 丁目 1 4 番 1 0 号

氏 名

花王株式会社